

大鼠钙化血管尾加压素 $\text{U}^{\text{①}}$ 及其受体上调

张勇刚^{1,2}, 张旭升¹, 魏睿宏³, 吴利标², 陈新胜¹, 李军¹, 许锡振⁴

(汕头大学医学院附属第一医院 1. 心内科, 2 分子生物学实验室, 4 神经内科;

3 汕头大学医学院附属第二医院, 广东省汕头市 515041)

[关键词] 尾加压素 $\text{U}^{\text{①}}$ 尾加压素 $\text{U}^{\text{①}}$ 受体; 血管钙化; 大鼠

[摘要] 目的 观察血管钙化大鼠主动脉和心肌尾加压素 $\text{U}^{\text{①}}$ 及其受体表达的变化。方法 采用维生素 D3 和尼古丁诱导大鼠血管钙化模型, 以 Von Kossa 染色检测血管钙化, 以原子吸收法和磷酸苯二钠法测定血管钙含量和碱性磷酸酶活性, 放射免疫法检测血浆、主动脉和心肌尾加压素 $\text{U}^{\text{①}}$ 含量, 免疫组织化学法检测血管尾加压素 $\text{U}^{\text{①}}$ 的表达, RT-PCR 法检测主动脉和心肌尾加压素受体 mRNA 水平。结果 维生素 D3 和尼古丁能够诱导大鼠典型血管钙化形成。Von Kossa 染色可见血管钙化大鼠主动脉有大量黑色颗粒沉淀, 血管钙含量、碱性磷酸酶活性明显升高, 主动脉尾加压素 $\text{U}^{\text{①}}$ 含量、主动脉和心肌尾加压素受体基因表达明显上调。精氨酸饮食能减轻血管钙化, 血管钙含量、尾加压素 $\text{U}^{\text{①}}$ 水平及尾加压素受体 mRNA 表达与单纯钙化组相比轻度下降, 但无统计学意义。蛋氨酸饮食能加重血管钙化, 增加钙含量, 上调尾加压素 $\text{U}^{\text{①}}$ 表达, 降低碱性磷酸酶活性。各组之间血浆尾加压素 $\text{U}^{\text{①}}$ 水平差异无统计学意义。结论 大鼠钙化血管尾加压素 $\text{U}^{\text{①}}$ 表达上调, 提示尾加压素 $\text{U}^{\text{①}}$ 可能参与了血管钙化的发展过程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Elevated Expression of Urotensin $\text{U}^{\text{①}}$ and Its Receptor in Vascular Calcification of Rats

ZHANG Yong-Gang^{1,2}, ZHANG Xu-Sheng¹, WEI Ru-Hong³, WU Li-Biao², CHEN Xin-Sheng¹, LI Jun¹, and XU Xi-Zhen⁴

(1 Department of Cardiovascular Diseases, 2 Laboratory of Molecular Biology & Cardiology, 4 Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong 515041, China; 3 Department of Internal Medicine, Second Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong 515041, China)

[KEY WORDS] Urotensin $\text{U}^{\text{①}}$ Urotensin $\text{U}^{\text{①}}$ Receptor Vascular Calcification Rats

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of urotensin $\text{U}^{\text{①}}$ ($\text{U}^{\text{①}}$) and its receptor (UT) in the aorta and myocardium in a rat model of vascular calcification, and explore the significance of $\text{U}^{\text{①}}$ system in vascular calcification.

Methods Arterial calcification of Sprague-Dawley rats was induced by Vitamin D3 plus nicotine (VDN). Calcification was confirmed by Von Kossa staining and measurement of calcium content. Alkaline phosphatases (ALP) activity was also evaluated. $\text{U}^{\text{①}}$ contents of plasma, aorta and myocardium were determined by radioimmunoassay. $\text{U}^{\text{①}}$ immunoactivity and UT mRNA expression were determined by immunohistochemistry and RT-PCR, respectively.

Results There were mass black granules deposited in aortic wall of the vascular calcified rats induced by VDN, with Von Kossa staining.

Calcium content and ALP activity in calcified aorta of these rats were increased significantly than the control rats ($P < 0.01$). Meanwhile, aortic $\text{U}^{\text{①}}$ and UT mRNA levels in calcified rats, as well as myocardial UT mRNA level were up-regulated significantly compared with the control group. In addition, high arginine diet could reduce the degree of vascular calcification by Von Kossa staining. Calcium contents, $\text{U}^{\text{①}}$ contents and UT mRNA levels were slightly lower, but not significantly in the VDN plus arginine rats than in the VDN treated rats. Furthermore, VDN plus high methionine diet treatment could exacerbate vascular calcification. Aortic calcium contents, as well as aortic and myocardial $\text{U}^{\text{①}}$ contents and UT mRNA expression, were further increased, while aortic ALP activity was decreased in the VDN plus methionine rats than in the calcified rats induced by VDN. There were no significant differences in plasma $\text{U}^{\text{①}}$ contents among these groups.

Conclusion This study found that $\text{U}^{\text{①}}$ /UT system was significantly increased in calcified vessels, suggesting that $\text{U}^{\text{①}}$ may be involved in the development of vascular calcification in a paracrine and/or autocrine manner.

血管钙化普遍存在于动脉粥样硬化、高血压和慢性肾病等疾病中, 是导致心血管事件的重要危险

因子^[1], 然而其机制仍未完全阐明。研究表明, 血管钙化与生理性骨质形成十分类似, 是主动的、可调

[收稿日期] 2010-06-08

[修回日期] 2010-07-15

[基金项目] 国家自然科学基金 (30470730 和 30971273) 及广东省自然科学基金 (9151051501000016) 资助

[作者简介] 张勇刚, 博士后, 心内科主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管发病机制, E-mail 为 zhangyong8686@hotmail.com。张旭升, 硕士, 医师, 研究方向为心血管发病机制, 现通讯地址为深圳市龙岗区人民医院。吴利标, 医师, 研究方向为心血管分子机制。

的过程,许多血管活性因子,如细胞因子、炎症因子等参与了血管钙化的调节过程^[2-4]。血浆同型半胱氨酸水平和血管钙化密切相关^[4],同型半胱氨酸能够加重血管钙化^[5],而左旋精氨酸能够减轻血管钙化^[6]。心血管组织产生的旁分泌活性肽亦参与了血管钙化过程,如血管紧张素 ② (Ang ②)^[7]、内皮素1(ET-1)^[8]。最近报道,一种新的缩血管活性肽尾加压素 ② (U ②)能够促进离体培养的血管平滑肌细胞(VSMC)中的钙沉积^[9]。然而,U ② 在血管钙化中的作用及其意义尚不清楚。为此,本研究在维生素D3和尼古丁诱导的大鼠钙化模型上观察了钙化血管组织U ② 及其受体(UT)表达的变化,以探讨U ② /UT系统在血管钙化发病中的意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物及药品

雄性SD大鼠由汕头大学医学院实验动物中心提供,体重160~180 g。维生素D3购自Sigma公司;尼古丁购自Merck公司;L-精氨酸购自北京擎科生物技术有限公司,纯度>99%;L-蛋氨酸购于北京宝希迪科技有限公司,纯度>99%;碱性磷酸酶试剂盒购自南京建成生物工程研究所;U ② 放射免疫试剂盒购自北京华英生物研究所;U ② 多克隆抗体及生物素标记羊抗兔二抗购自武汉博士德公司;RNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;逆转录试剂盒、PCR试剂盒购于Promega公司;PCR引物由上海英骏生物公司合成,UT正向引物序列为5'-GCA TCT TCA CCC TGA CCA TAA-3',反向引物序列为5'-CCC AGA AGA GAA GGA CGA TAC C-3',UT扩增产物长度399 bp。内参 β -actin正向引物序列为5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC-3',反向引物序列为5'-AGC CAG GTC CAG ACG CA-3', β -actin扩增产物长度291 bp。其余为进口或国产分析纯试剂。

1.2 钙化动物模型制备

参照文献[7]方法制备钙化动物模型。雄性SD大鼠随机分四组,每组10只:正常对照组:给予其它组等量的生理盐水肌注和单纯花生油灌胃;④单纯钙化组:第1天早8:00维生素D3(300 kU/kg)肌肉注射,尼古丁(25 mg/kg)溶于花生油中灌胃,晚18:00尼古丁重复灌胃一次;④钙化+L-精氨酸组:模型制作同单纯钙化组,同时第2天始予以L-精氨酸[1 g/(kg·d)]灌胃;钙化+L-蛋氨酸组:模型制作同单纯钙化组,同时第2天开始予

L-蛋氨酸[1 g/(kg·d)]灌胃。四组动物常规饲养4周后称重,2%戊巴比妥钠麻醉,然后下腔静脉取血,加入预先加有EDTA和抑肽酶的试管内,4℃离心分离血浆,-70℃储存待测。摘取心脏和主动脉,用冰生理盐水冲洗后,部分石蜡包埋用于Von Kossa染色,其余液氮速冻,-70℃储存待测。

1.3 Von Kossa染色

取大鼠心肌和胸主动脉段,石蜡包埋,制作4 μm 厚切片,常规脱蜡、脱水,浸入1%硝酸银溶液,在紫外线下照射30 min后,将切片置于5%硫代硫酸钠溶液中1 min,0.25%碱性品红返染,经脱水、透明、封片,在光镜下观察。

1.4 心肌和血管组织碱性磷酸酶活性测定

取腹主动脉组织40 mg加入PBS制备匀浆,4℃、1600 \times g离心10 min,吸取上清液,用考马斯亮蓝法进行蛋白定量后,根据试剂说明书采用磷酸苯二钠法测定碱性磷酸酶(AKP)活性。

1.5 血管组织钙含量测定

取25 mg心肌及15 mg左右腹主动脉组织分别置于10 mL玻璃离心管中,置入烤箱,110℃烘烤1 h,取出加入200 μL 优级纯硝酸,80℃水浴45 min,待样品消化完全后加入200 μL 30%过氧化氢,样品呈清澈浅黄色或无色后,加入超纯水定容5 mL待测,原子分光光度计(岛津AA-660型)在422.7 nm处读取吸光值,自标准曲线上计算钙含量。

1.6 血浆和主动脉尾加压素 ② 含量测定

参照文献[10],采用放射免疫分析法测定。

1.7 免疫组织化学法检测大鼠主动脉尾加压素 ② 蛋白的表达

参照文献[11],采用4%多聚甲醛固定大鼠胸主动脉,常规脱脂至水,采用SABC法按试剂说明书进行。

1.8 RT-PCR法检测心脏和主动脉尾加压素受体mRNA

RNA提取和RT-PCR参照文献[11]。取约50 mg大鼠主动脉组织,倒入少许液氮,研磨,根据试剂盒说明提取RNA,紫外分光光度计定量。取RNA 1 μg 进行逆转录。PCR条件:初始变性95℃ 2 min,然后95℃ 0.5 min,50℃ 0.5 min,72℃ 0.5 min,运行35个循环后,然后72℃ 5 min,进行1%琼脂糖凝胶电泳,电压100 V,时间40 min,采用凝胶成像仪进行半定量分析。

1.9 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠主动脉血管钙化情况

维生素 D3 和尼古丁诱导后血管中膜弹性纤维间有大量黑色颗粒沉积, 表明血管内有大量钙盐沉积、典型血管钙化形成; 钙化 + L-蛋氨酸组可见血管有白色斑点, 管壁僵硬, 血管钙化较单纯钙化组更为明显; 而钙化 + L-精氨酸组血管钙化程度低于单纯血管钙化组 (图 1)。

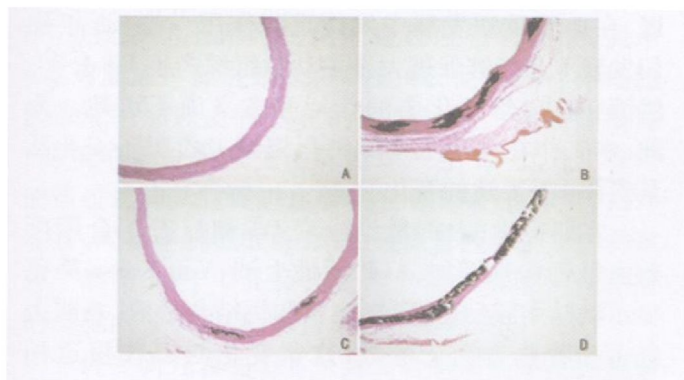


图 1 大鼠主动脉 Von Kossa 染色 ($\times 100$) A 为正常对照组, B 为单纯钙化组, C 为钙化 + L-精氨酸组, D 为钙化 + L-蛋氨酸组。

2.2 大鼠主动脉钙含量、碱性磷酸酶及心重/体重比的变化

钙化血管钙含量明显高于正常对照组, 单纯钙化组、钙化 + L-精氨酸组及钙化 + L-蛋氨酸组主动脉钙含量分别较正常对照组高 1.2 倍、0.8 倍和 5.9 倍 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 钙化 + L-精氨酸组钙含量略低于单纯钙化组 ($P > 0.05$); 钙化 + L-蛋氨酸组主动脉钙含量明显高于单纯钙化组 ($P < 0.01$; 表 1)。单纯钙化组血管 ALP 活性明显高于正常对照组 ($P < 0.05$); 钙化 + L-精氨酸组 ALP 活性较单纯钙化组有所下降, 但无统计学意义 ($P > 0.05$); 钙化 + L-蛋氨酸组 ALP 活性明显低于单纯钙化组 ($P < 0.01$), 略低于正常对照组 ($P > 0.05$); 各组间心重/体重比无统计学差异 ($P > 0.05$), 表明单纯钙化组、钙化 + L-精氨酸组以及钙化 + L-蛋氨酸组和正常对照组相比无明显心肌肥大 (表 1)。

2.3 大鼠血浆和主动脉尾加压素 U 含量的变化

血管钙化大鼠主动脉 U 含量明显升高, 单纯钙化组、钙化 + L-精氨酸组及钙化 + L-蛋氨酸组主动脉组织 U 分别较正常对照组高 2.0 倍、1.6 倍和 1.9 倍 ($P < 0.05$); 与单纯钙化组相比, 钙化 + L-精氨酸组和钙化 + L-蛋氨酸组主动脉 U 含量无统计学意义 ($P > 0.05$)。单纯钙化组和钙化 + L-精氨酸组

酸组心肌 U 含量略高于正常对照组 ($P > 0.05$); 钙化 + L-蛋氨酸组心肌组织 U 明显高于正常对照组 ($P < 0.05$); 与单纯钙化组相比, 钙化 + L-精氨酸组心肌 U 含量有所降低, 而钙化 + L-蛋氨酸组有所升高, 但均无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组间血浆 U 含量无显著性差异 ($P > 0.05$; 表 2)。免疫组织化学染色显示, 单纯钙化组、钙化 + L-精氨酸组及钙化 + L-蛋氨酸组大鼠主动脉 U 的表达高于正常对照组, 与放射性免疫结果相一致 (图 2)。

表 1 各组大鼠血钙含量、碱性磷酸酶及心重/体重比的变化 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	血管钙含量 ($\mu\text{mol/g}$)	ALP (U/g)	心重/体重比 (mg/g)
正常对照组	8.56 \pm 2.87	526.6 \pm 201.1	3.24 \pm 0.30
单纯钙化组	19.16 \pm 3.80 ^b	880.9 \pm 446.3 ^a	3.38 \pm 0.40
钙化 + L-精氨酸组	15.68 \pm 4.24	674.5 \pm 296.2	3.50 \pm 0.24
钙化 + L-蛋氨酸组	58.66 \pm 16.79 ^{b,c}	331.1 \pm 113.2 ^c	3.33 \pm 0.28

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与单纯钙化组。

表 2 大鼠主动脉、心肌和血浆 U 含量变化

分 组	血管 U 含量 (ng/g)	心肌 U 含量 (ng/g)	血浆 U 含量 (ng/L)
正常对照组	0.41 \pm 0.34	0.2 \pm 0.1	2.33 \pm 0.98
单纯钙化组	1.25 \pm 0.51 ^a	0.5 \pm 0.4	2.48 \pm 1.40
钙化 + L-精氨酸组	1.08 \pm 0.54 ^a	0.3 \pm 0.2	2.20 \pm 0.49
钙化 + L-蛋氨酸组	1.17 \pm 0.22 ^a	0.9 \pm 0.8 ^a	3.38 \pm 0.71

a 为 $P < 0.05$ 与正常对照组比较。

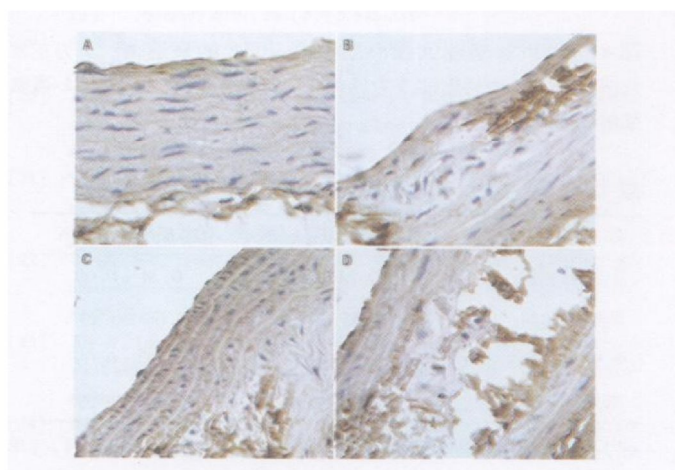


图 2 大鼠主动脉 U 的免疫组织化学染色 ($\times 400$) A 为正常对照组, B 为单纯钙化组, C 为钙化 + L-精氨酸组, D 为钙化 + L-蛋氨酸组。棕褐色为阳性表达。

2.4 主动脉和心肌组织尾加压素受体 mRNA 表达

单纯钙化组主动脉 UT mRNA 表达明显升高,

较正常对照组高 0.8 倍 ($P < 0.05$); 钙化 + L-精氨酸组主动脉 UT mRNA 表达略高于正常对照组 ($P > 0.05$); 钙化 + L-蛋氨酸组主动脉 UT mRNA 表达较正常对照组高 1.7 倍 ($P < 0.01$); 与单纯钙化组相比, 钙化 + L-精氨酸组主动脉 UT mRNA 表达略有下降 ($P > 0.05$), 而钙化 + L-蛋氨酸组明显升高 ($P < 0.01$; 表 3 和图 3)。单纯钙化组心肌 UT mRNA 表达明显升高, 较正常对照组高 0.9 倍 ($P < 0.05$); 而钙化 + L-精氨酸组心肌 UT mRNA 表达略高于正常对照组 ($P > 0.05$); 钙化 + L-蛋氨酸组心肌 UT mRNA 表达明显升高, 较正常对照组高 1.2 倍 ($P < 0.05$); 与单纯钙化组相比, 钙化 + L-精氨酸组有所下降, 而钙化 + L-蛋氨酸组略有升高, 但均无统计学意义 ($P > 0.05$; 表 3 和图 4)。

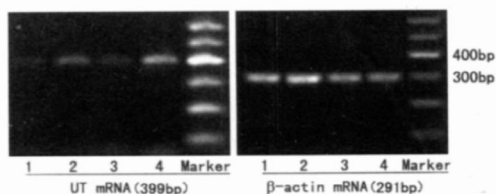


图 3. RT-PCR 检测大鼠主动脉 UT mRNA 的表达 1 为正常对照组, 2 为单纯钙化组, 3 为钙化 + L-精氨酸组, 4 为钙化 + L-蛋氨酸组

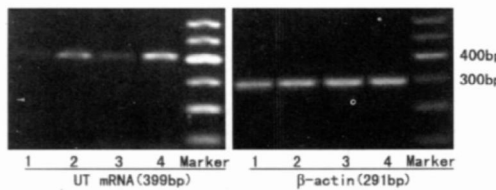


图 4. RT-PCR 检测大鼠心肌 UT mRNA 的表达 1 为正常对照组, 2 为单纯钙化组, 3 为钙化 + L-精氨酸组, 4 为钙化 + L-蛋氨酸组。

表 3 大鼠主动脉及心肌 UT mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

分 组	主动脉 UT mRNA	心肌 UT mRNA
正常对照组	0.31 ± 0.10	0.31 ± 0.09
单纯钙化组	0.55 ± 0.09 ^a	0.60 ± 0.23 ^a
钙化 + L-精氨酸组	0.48 ± 0.16	0.40 ± 0.09
钙化 + L-蛋氨酸组	0.83 ± 0.16 ^{bc}	0.67 ± 0.16 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与单纯钙化组比较。

3 讨论

血管钙化的机制至今尚未完全阐明^[1,7]。近年研究表明, 成骨样表型细胞形成是血管钙化发生、发展的重要基础和核心, 通常由平滑肌细胞、周细胞通

过表型转化而来, 亦可源于血液循环中的间充质祖细胞^[1,3]。现已发现, 许多因子能够调节成骨样表型细胞的形成, 调节血管钙化的发展^[1-3]。此外, 心血管组织通过自分泌和旁分泌方式产生的内源性血管活性肽亦参与调节血管钙化的发生和发展, 如垂体中叶素能够减轻血管钙化^[12], 而血管紧张素 ② (Ang②)、内皮素 1 (ET-1) 则加重血管钙化^[7,8]。U②是继 ET-1 之后发现的哺乳动物内源性缩血管活性肽^[13,14], 参与了多种心血管疾病的发生和发展, 在血管重塑发展中发挥重要作用^[15,16], 近年我们发现 U②能够促进大鼠主动脉组织产生 ET-1^[17], 然而它在血管钙化中的作用和意义尚不清楚。为此, 本工作在大鼠主动脉钙化模型上检测了 U②及其受体 UT 表达的变化。

本研究中, 大剂量维生素 D3 和尼古丁合用可致血管钙含量增加, ALP 活性上调, Von Kossa 染色显示动脉中膜、弹力膜钙沉积和钙结节形成, 表明大鼠主动脉典型钙化形成, 这些变化与以往报道相近^[5]。同时, 该研究首次发现钙化大鼠主动脉 U②含量明显增加, UT mRNA 表达明显上调, 钙化 + L-蛋氨酸组主动脉钙盐沉积和钙结节形成进一步明显, 钙含量进一步增高, 钙化程度更为明显, 但 ALP 活性低于单纯钙化组。尽管有研究表明 ALP 是成骨细胞早期分化重要标志物, 对骨化作用发挥重要作用, 而该结果提示蛋氨酸加重血管钙化的作用可能通过其它途径来实现的^[5]。有报道 L-精氨酸可通过改善 L-Arg/NO 途径障碍减轻血管钙化^[6]。本研究还发现, 与单纯钙化组相比, 钙化 + L-精氨酸组主动脉钙盐沉积和钙结节有所减少, 钙含量有所降低, 可能与剂量、喂养的时间有关。另外, 主动脉 U②系统表达上调与钙化程度相一致, 并且在蛋氨酸加重血管钙化同时, UT mRNA 表达明显上调, 提示 U②系统可能在血管钙化中发挥重要的加速作用。大鼠心重/体重比在各组间无明显差异, 表明血管钙化大鼠无明显心肌肥大形成, 然而心肌组织 UT mRNA 明显上调, 尤其在钙化 + L-蛋氨酸组大鼠进一步明显上调, 提示心肌组织局部的 U②/UT 系统亦参与了血管钙化大鼠心血管功能失调的发展过程。

对 U②在血管钙化过程中的作用机制尚待阐明。Ames 等^[14]首先报道 U②能够促进钙离子内流, 并通过 Ca^{2+} 发挥生物学效应。U②不仅具有缩血管效应, 还能够促进 VSMC 和成纤维细胞增殖, 促进泡沫细胞形成, 协同其它危险因素如 Ang②和氧化型低密度脂蛋白的促细胞增殖作用和缩血管作

用,这些作用能够被钙通道阻断剂所阻断^[9 17-21]。近年报道外源性 U^②能够加重大鼠主动脉内皮剥脱后血管再狭窄过程,UT特异性阻断剂能够减轻再狭窄程度^[15 16]。我们近年发现 U^②能够促进血管外膜成纤维细胞的表型转变,促进其迁移和胶原合成,这些效应可通过钙离子来实现^[11 20]。在离体培养的大鼠 VSMC 上, U^②能够促进 β -甘油磷酸诱导 VSMC 钙盐沉积,上调 ALP 活性,促进钙摄入,促进细胞钙化形成^[9]。本研究发现,血管钙化时 U^②/UT 系统表达上调与钙化严重程度密切相关,提示 U^②可能通过促进细胞内钙超载、促进成骨样细胞的形成来加速血管钙化的发展过程。我们曾报道 U^②能够促进大鼠主动脉组织产生 ET-1, U^②有可能通过协同其它促进血管钙化的因子的作用,如内皮素、同型半胱氨酸等,来促进血管钙化的发生和发展。然而,对于 U^②及其受体上调的机制及其作用的细胞内分子机制,有待于进一步研究。

许多研究表明 U^②及其受体系统在多种血管重塑和心肌重塑疾病中表达上调,Ames 等^[14]首先报道动脉粥样硬化斑块组织 U^②及其受体 UT 表达上调,Douglas 等^[22]报道慢性心功能不全患者心肌组织 U^②及其受体结合位点上调。我们曾发现慢性缺氧右心室肥大大鼠心肌组织 U^②及其受体结合位点上调^[10]。在大鼠主动脉内皮剥脱后再狭窄模型上, U^②和 UT 基因表达、U^②受体结合位点明显增加^[15 16]。最近报道糖尿病大鼠主动脉 U^②和 UT 明显升高^[23],在自发性高血压大鼠,心肌和主动脉 U^②及其受体 UT mRNA 明显高于 WKY 对照大鼠^[24]。本研究发现,血管钙化模型大鼠血管组织 U^②及其受体上调,提示 U^②除了参与上述疾病外,还参与了血管钙化的发生和发展,而针对 U^②进行干预有可能为进一步防治血管钙化等心血管重塑性疾病的发生和发展提供新的作用靶点。对于 U^②在血管钙化中的作用和意义值得深入探讨。

[参考文献]

- [1] Demer LL, Tsim Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease [J]. *Circulation*, 2008, **117** (22): 2 938-948.
- [2] Lehman SJ, Massaro JM, Schlett CL, et al. Periaortic fat: cardiovascular disease risk factors and aortic calcification: the Framingham Heart Study [J]. *Atherosclerosis*, 2010, **210** (2): 656-661.
- [3] Akawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, et al. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo [J]. *Circulation*, 2007, **116** (24): 2 841-850.
- [4] Van Campenhout A, Moran CS, Parr A, et al. Role of homocysteine in aortic calcification and osteogenic cell differentiation [J]. *Atherosclerosis*, 2009, **202** (2): 557-566.
- [5] 杨英, 于芳, 李菊香, 等. 高同型半胱氨酸血症促进大鼠血管钙化 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2004, **20** (4): 333-336.
- [6] 张宝红, 吴胜英, 庞永正, 等. L-精氨酸和一氧化氮抑制剂对大鼠血管钙化的影响 [J]. *基础医学与临床*, 2003, **23** (6): 599-603.
- [7] Wu SY, Zhang BH, Pan CS, et al. Endothelin-1 is a potent regulator in vivo in vascular calcification and in vitro in calcification of vascular smooth muscle cells [J]. *Peptides*, 2003, **24** (8): 1 149-156.
- [8] 吴胜英, 潘春水, 刘秀华, 等. 内源性血管紧张素^②对大鼠血管钙化的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2004, **20** (11): 1 961-965.
- [9] 张宝红, 陈晓波, 李尔珍, 等. 尾加压素^②加重 β -甘油磷酸诱导的大鼠血管平滑肌细胞钙化 [J]. *中国药理学通报*, 2009, **25** (12): 1 567-570.
- [10] Zhang YG, Li JX, Cao J, et al. Effect of chronic hypoxia on contents of urotensin^② and its functional receptors in rat myocardium [J]. *Heart Vessels*, 2002, **16** (2): 64-68.
- [11] Zhang YG, Li YG, Wei RH, et al. Urotensin^② is an autocrine/paracrine growth factor for aortic adventitia of rat [J]. *Regul Pept*, 2008, **151** (1-3): 88-94.
- [12] Cai Y, Xu M, J Teng X, et al. Intermedin inhibits vascular calcification by increasing the level of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, **85** (4): 864-873.
- [13] Couluam Y, Lihmann I, Jegou S, et al. Cloning of the cDNA encoding the urotensin^② precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin^② gene in motoneurons of the spinal cord [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (26): 15 803-808.
- [14] Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, et al. Human urotensin^② is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14 [J]. *Nature*, 1999, **401** (6750): 282-286.
- [15] Zhang LF, Ding WH, Shi LR, et al. Effects of exogenous urotensin^② on vascular remodelling after balloon injury [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, **37** (4): 477-481.
- [16] Rakowski E, Hassan GS, Dhanak D, et al. A role for urotensin^② in restenosis following balloon angioplasty: use of a selective UT receptor blocker [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, **39** (5): 785-791.
- [17] 张勇刚, 魏睿宏, 张珺辉, 等. 尾加压素^②促进大鼠主动脉合成和分泌内皮素 1 的机制研究 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (3): 165-167.
- [18] Grison D, Ginion A, Decroly N, et al. Urotensin^② induction of adult cardiomyocytes hypertrophy involves the Akt/GSK-3 β signaling pathway [J]. *Peptides*, 2010, **31** (7): 1 326-333.
- [19] 张勇刚, 陈亚红, 马春艳, 等. 尾加压素^②的促丝裂作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (1): 14-16.
- [20] Zhang YG, Li J, Li YG, et al. Urotensin^② induces phenotypic differentiation, migration and collagen synthesis of adventitial fibroblasts from rat aorta [J]. *J Hypertens*, 2008, **26** (6): 1 119-126.
- [21] Watanabe T, Suguro T, Kanome T, et al. Human urotensin^② accelerates foam cell formation in human monocyte-derived macrophages [J]. *Hypertension*, 2005, **46** (4): 738-744.
- [22] Douglas SA, Tayara L, Ohlstein EH, et al. Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin^② [J]. *Lancet*, 2002, **359** (9322): 1 990-997.
- [23] Xie N, Liu L. Elevated expression of urotensin^② and its receptor in great artery of type 2 diabetes and its significance [J]. *Biomol Pharmacol*, 2009, **63** (10): 734-741.
- [24] Hirose T, Takahashi K, Mori N, et al. Increased expression of urotensin^②, urotensin^②-related peptide and urotensin^② receptor mRNAs in the cardiovascular organs of hypertensive rats: comparison with endothelin-1 [J]. *Peptides*, 2009, **30** (6): 1 124-129.

(此文编辑 文玉珊)